

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-148185

(43)公開日 平成6年(1994)5月27日

| (51)Int.Cl. ^a | 酸別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|----------|-----|--------|
| G 0 1 N 33/533 | | 8310-2 J | | |
| C 0 7 D 213/74 | | | | |
| C 0 7 H 15/04 | E | | | |
| C 0 9 K 11/08 | Z | 8158-4 H | | |
| G 0 1 N 31/22 | 1 2 2 | 7908-2 J | | |

審査請求 未請求 請求項の数8(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平4-82804

(22)出願日 平成4年(1992)3月4日

(71)出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72)発明者 加藤 英雄

尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式
会社大阪研究所内

(72)発明者 山本 直之

尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式
会社大阪研究所内

(72)発明者 黒村 慎二

尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式
会社大阪研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 水酸基を有する化合物の蛍光標識化方法及び試薬

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 ビリジルアミノ基を、例えば糖質、糖蛋白質、糖ペプチド、糖脂質、アルコール類、フェノール類等の水酸基を有する化合物に、容易に且つ収率良く導入し得る方法及び試薬を提供する。

【構成】 下記式(1)

$$R1-(CH_2)_n-OH \quad (1)$$

(式中、R1は2-ビリジルアミノ基又は3-ビリジルアミノ基を表わし、nは1~4の整数を表わす。)で示される化合物又はその塩を標識化試薬として用いて標識化することを特徴とする、水酸基を有する化合物の蛍光標識化方法及び上記の蛍光標識化試薬。

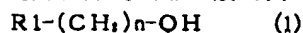
(2)

特開平6-148185

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記一般式(1)



(式中、R1は2-ピリジルアミノ基又は3-ピリジルアミノ基を表わし、nは1～4の整数を表わす。)で示される化合物又はその塩を標識化試薬として用いて標識化することを特徴とする、水酸基を有する化合物の蛍光標識化方法。

【請求項2】水酸基を有する化合物が糖質である請求項1に記載の蛍光標識化方法。

【請求項3】還元末端に脱離基を導入した後、或は1級又は2級の水酸基を活性化処理した後、一般式(1)で示される化合物又はその塩を用いて標識化を行う請求項2に記載の蛍光標識化方法。

【請求項4】水酸基を有する化合物が糖蛋白質、糖ペプチド又は糖脂質である請求項1に記載の蛍光標識化方法。

【請求項5】糖鎖の還元末端に脱離基を導入した後、或は糖鎖の1級又は2級の水酸基を活性化処理した後、一般式(1)で示される化合物又はその塩を用いて標識化を行う請求項4に記載の蛍光標識化方法。

【請求項6】水酸基を有する化合物がアルコール類又はフェノール類である請求項1に記載の蛍光標識化方法。

【請求項7】アルコール類又はフェノール類の1級又は2級の水酸基を活性化処理した後、一般式(1)で示される化合物又はその塩を用いて標識化を行う請求項6に記載の蛍光標識化方法。

【請求項8】請求項1に記載の一般式(1)で示される化合物又はその塩を含んで成ることを特徴とする、水酸基を有する化合物の蛍光標識化試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の利用分野】本発明は、例えば糖質、糖蛋白質、糖脂質、アルコール類、フェノール類等の水酸基を有する化合物の蛍光標識化方法に関する。

【0002】

【発明の背景】測定対象物質を蛍光物質で標識した後、その蛍光を利用して該物質を測定する方法は、試料中にナノモル～ピコモル程度しか含まれていない微量物質の測定方法として広く利用されている。

【0003】しかしながら、従来から用いられている測定対象物質を蛍光標識するための試薬、即ちフルオレッセンインゾシアネート(FITC)、エオシン、クマリンインゾシアネート等の蛍光標識化試薬は、それ自体の水溶性が低いため種々の問題点を有していた。即ち、例えば水溶液中に含まれている微量物質を蛍光標識化する際には、上記した如き蛍光標識化試薬は一旦極性有機溶媒に溶解して用いなければならないため、蛍光標識化操作が煩雑であることや、上記した如き蛍光標識化試薬を用いて調製された蛍光標識化物質はそれ自体の水溶性が

2

低下するため、例えば上記蛍光標識化試薬を用いて調製された蛍光標識化抗体を利用して他の物質の検出を行う場合に必要濃度の水溶液を調製することができない場合があること、等である。

【0004】これらの問題点を解決する目的で、例えばスルホ基、カルボキシル基等の水溶性基を導入した、例えばダンシルクロライド、ルシファーイエロー、 α -フタルアルデヒド等の水溶性蛍光標識化試薬が開発された。しかしながら、これらを用いて調製された蛍光標識化物質は、水溶性という面では改善されたものの、それ自体の保存安定性が悪い、調製後の保存ができないという問題点を有していた。

【0005】一方、例えば2-アミノピリジン、3-アミノピリジン等のアミノピリジンは、それ自体水溶性で且つ非常に安定な蛍光物質であり、これにより標識された物質も保存安定性に優れ、且つ標識対象物質が水溶性のもの場合には水溶性がそのまま維持されるため、糖質等への蛍光標識物質として近時広く利用されている化合物である(Biochemical and Biophysical Research Communications 85, 267頁, 1978等)。

【0006】しかしながら、アミノピリジンそのものを、糖質等の標識物質として用いるには問題があった。即ち、アミノピリジンを用いた蛍光標識化方法としては、標識対象物質のアルデヒド基にシッフ塩基を介して結合させる方法が一般的であるが、該方法を利用してアミノピリジンを糖質に結合させた場合には、糖質の還元末端側の糖残基の環が開環してしまうため、蛍光標識化した糖質を糖転移酵素や糖分解酵素等の基質として用いるためには目的の構造を有する糖質の還元末端側に更にもう一つ余分な糖残基を結合させておかねばならないと言う問題がそれである。

【0007】そのため、ピリジルアミノ基等の蛍光を有する基を、穏和な条件下で、且つ還元末端側の糖残基の環を開環させることなく容易に糖質等に導入し得る蛍光標識化試薬の開発とこれを用いた新規な蛍光標識化方法の出現が待ち望まれていた。

【0008】池中らは、上記問題を解決するため、糖質の還元末端の一位の水酸基に蛍光を有する置換アミノアルキル基をグリコシド結合により結合させる方法を開発した(特開平1-42496号公報)。

【0009】この方法は、穏和な条件下で、しかも糖質の還元末端側の糖残基の環を開環させることなく糖質の還元末端の一位の水酸基に蛍光を有する置換アミノアルキル基を導入し得る方法なので、従来の方法に比較して明らかに有利な方法ではあるが、糖質からの合成工程が7工程と長いことや、合成の途中で副生成物が生ずるため目的物の収率が必ずしも高くないこと等の問題点をも有しており、更なる改良が望まれていた。

【0010】

【発明の目的】本発明は、上記した如き状況に鑑みなさ

(3)

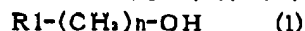
特開平6-148185

3

れたもので、ビリジルアミノ基を、例えば糖質、糖蛋白質、糖ペプチド、糖脂質、アルコール類、フェノール類等の水酸基を有する化合物に、容易に且つ収率良く導入し得る方法及び試薬を提供することをその目的とする。

【0011】

【発明の構成】本発明は、下記一般式(1)



(式中、R1は2-ビリジルアミノ基又は3-ビリジルアミノ基を表わし、nは1~4の整数を表わす。)で示される化合物又はその塩を標識化試薬として用いて標識化することを特徴とする、水酸基を有する化合物への蛍光標識化方法、の発明である。

【0012】また、本発明は、上記一般式(1)で示される化合物又はその塩を含んで成ることを特徴とする、水酸基を有する化合物の蛍光標識化試薬、の発明である。

【0013】即ち、本発明者らは、糖質の還元末端の一位の水酸基にビリジルアミノ基を導入する方法に付鋭意研究の途上、上記一般式(1)で示される化合物が、還元末端に脱離基が導入された糖質、糖鎖の還元末端に脱離基を導入した糖蛋白質、糖ペプチド、糖脂質等、或は活性化された水酸基を有するこれら各種化合物及びアルコール類、フェノール類等と容易に反応することを見出し、この反応を利用することにより本発明の目的を達成し得ることを見出し本発明を完成するに至った。

【0014】本発明に係る一般式(1)で示される化合物の塩としては、一般式(1)に於ける水酸基の水素原子が例えばナトリウム原子、カリウム原子等のアルカリ金属原子や、例えばカルシウム原子等のアルカリ土類金属原子で置換された化合物が挙げられる。

【0015】本発明に係る一般式(1)で示される化合物は例えば以下の如くして容易に合成し得る。即ち、例えば2-クロロビリジン、2-ブロモビリジン、3-クロロビリジン、3-ブロモビリジン等の2-又は3-ハロビリジンと、該ハロビリジン1モルに対して1~20モルのアミノアルコール類(例えばエタノールアミン、3-アミノ-1-プロパノール等)とを、80~120℃で8~24時間攪拌下に反応させる。反応後は、反応液を減圧濃縮し、目的物をクロロホルム、ジクロロメタン等で抽出した後、溶媒を除去すれば、一般式(1)で示される化合物[例えば2-(2-ヒドロキシエチル)アミノビリジン、2-(3-ヒドロキシプロピル)アミノビリジン等]が容易に得られる。これを、該化合物1当量に対して通常1~2当量、好ましくは1~1.1当量の、アルカリ金属類(例えば金属ナトリウム、金属カリウム等)又は金属水素化物(例えば水素化ナトリウム、水素化カリウム、水素化カルシウム等)と、例えばベンゼン、トルエン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド等の溶媒中、0~20℃で6~12時間攪拌、反応させ、反応液を減圧濃縮した後、要すれば常法により生成することにより、一般式(1)で示される化合物の塩、即ち一般式(1)に於ける水酸基の水素原子

4

が、例えばナトリウム原子、カリウム原子等のアルカリ金属原子や、例えばカルシウム原子($\times 1/2$)等のアルカリ土類金属原子($\times 1/2$)に置換された化合物が得られる。

【0016】本発明の方法により蛍光標識化が可能な水酸基を有する化合物としては、その水酸基が例えばケーニッヒクノール法、トリクロロアセトイミデート法等の糖質の合成の際に用いられる糖質の還元末端への脱離基の導入方法により脱離基の導入が可能なもの、或は例えばp-トルエンスルホン基、メタンスルホン基等の脱離基を導入する水酸基の活性化法により活性化が可能なものであれば特に限定することなく挙げられる。より具体的には、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、フコース、シアル酸、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン等の単糖類、これらの単糖類から構成される二糖類、少糖類、多糖類等の糖質、糖ペプチド、糖蛋白質、糖脂質、例えばエタノール、プロパノール等のアルコール類、例えばカテコール、トロフェロール等のフェノール類等が好ましく挙げられる。

【0017】尚、これら二糖類、少糖類、多糖類等の糖質、或は糖ペプチド、糖蛋白質、糖脂質等に於ける糖鎖の構成糖の種類及び数には特に制限はないが、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、フコース、シアル酸、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン等の糖残基から構成され、その糖残基の数が2~10個程度のものが好ましく挙げられる。また、これら糖質や糖鎖の糖残基間の結合の種類にも特に制限はなく、例えば $\alpha 1 \rightarrow 4$ 、 $\beta 1 \rightarrow 4$ 、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 、 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 、 $\beta 1 \rightarrow 2$ 、 $\beta 1 \rightarrow 3$ 、 $\alpha 2 \rightarrow 6$ 、 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 、 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 、 $\beta 1 \rightarrow 6$ 等何れにてもよい。但し、本発明の方法により蛍光標識化された糖質、糖ペプチド、糖蛋白質、糖脂質等を糖転移酵素や糖分解酵素の基質として用いる場合には、その構造は目的とする糖転移酵素のアクセプターや糖分解酵素の基質と成り得る構造を有していなければならないことは言うまでもない。

【0018】本発明の蛍光標識化方法は、以下の如くして容易に実施し得る。即ち、例えば糖質や糖ペプチド、糖蛋白質、糖脂質等に於ける糖鎖の還元末端水酸基を蛍光標識化する場合には、例えばファルマシア、27巻、No. 1、50~57(1991)等に記載された糖質や糖鎖の還元末端に脱離基を導入する方法を利用して、以下の如くして実施すればよい。

【0019】即ち、例えばケーニッヒクノール法を利用する場合には、例えば無水酢酸-ビリジンをを用いる常法によりアセチル化された糖質、糖ペプチド、糖蛋白質、糖脂質等(以下、これらを総称して「糖類」と略記する。)を、例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の溶媒中で、例えば30%臭化水素/酢酸、四臭化チタン等を使用してブロム化するか、例えばクロロホルム、ベンゼン等の溶媒中で例えば塩化亜鉛、塩化チオニル等を使

10

20

30

40

50

5

用してクロル化する等の常法により糖鎖の還元末端をハロゲン化した後、例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の溶媒中で、例えば炭酸銀、酸化銀、ケイ酸銀、過塩素酸銀、トリフルオロメタンスルホン酸銀、酸化水銀、シアン化水銀等の重金属塩の存在下で本発明に係る一般式(1)で示される化合物と縮合反応させることにより容易に糖鎖の還元末端水酸基を蛍光標識化することができる。

【0020】また、例えばトリクロロアセトイミデート法を利用する場合には、例えば無水酢酸-ピリジンを用いる常法によりアセチル化された糖類を、ヒドラジン酢酸等を用いる常法により1-ヒドロキシアセチル化糖類とした後、例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の溶媒中、例えば炭酸カリウム、水素化ナトリウム、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン等の塩基の存在下、トリクロロアセトニトリルを反応させることにより、トリクロロアセトイミデート体とし、次いでこれを例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の溶媒中、例えば三フッ化ホウ素-エーテルコンプレックス、トリメチルシリルトリフレート等の反応開始剤を用いて本発明に係る一般式(1)で示される化合物と縮合反応させることにより容易に糖鎖の還元末端水酸基を蛍光標識化することができる。

【0021】また、例えば無水酢酸-ピリジンを用いる方法によりアセチル化された糖類を、例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の溶媒中、例えば三フッ化ホウ素-エーテルコンプレックス、トリメチルシリルトリフレート等の存在下に例えばトリメチルシリルチオメチル等を反応させることによりチオグリコシド体とし、次いでこれを例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の溶媒中で例えばジメチル(メチルチオ)スルホニウムトリフレート、臭化銅(II)-テトラブチルアンモニウムブロミド-銀トリフレート、フェニルセレネニルトリフレート等の反応試剤を用いて本発明に係る一般式(1)で示される化合物と縮合反応させることにより容易に糖鎖の還元末端水酸基を蛍光標識化することができる。

【0022】更に、例えば上述した如くして得たチオグリコシドを、例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の溶媒中で例えば三フッ化ジエチルアミノ硫酸/N-プロモコハク酸イミド、フッ化水素-ピリジン/N-プロモコハク酸イミド等を反応させる等の常法によりフッ化糖とし、次いでこれを例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の溶媒中で、例えば塩化スズ(II)-過塩素酸銀、三フッ化ホウ素-エーテルコンプレックス、トリメチルシリルトリフレート等の反応試剤を用いて本発明に係る一般式(1)で示される化合物と縮合させることにより容易に糖鎖の還元末端水酸基を蛍光標識化することができる。

【0023】また、例えば糖類やアルコール類、フェノール類の1級又は2級水酸基を蛍光標識化する場合も、

(4)

特開平6-148185

6

自体公知の水酸基の活性化方法を利用することにより容易に実施し得る。即ち、例えば糖類やアルコール類、フェノール類の1級又は2級水酸基を蛍光標識化する場合には、例えばピリジン、クロロホルム-トリエチルアミン等の溶媒中で、糖類やアルコール類、フェノール類に、例えばp-トルエンスルホニルクロライド、メタンスルホニルクロライド等を反応させる常法により、1級又は2級水酸基に例えばp-トルエンスルホニル基、メタンスルホニル基等の脱離基を導入し、次いでこれを、これ1モルに対して通常1~5モル、好ましくは2~3モルの本発明に係る一般式(1)で示される化合物の塩と、例えばベンゼン、トルエン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等の溶媒中、30~120℃で、6~24時間攪拌、反応させれば、該1級又は2級水酸基を容易に蛍光標識化することができる。

【0024】また、例えば1,2位、2,3位、3,4位等にtrans-ジオールを形成する1級又は2級の水酸基を有する化合物の水酸基を蛍光標識化する場合には、先ず、例えば上述した如くして1級又は2級の水酸基にp-トルエンスルホニル基、メタンスルホニル基等の脱離基を導入した化合物を、例えばメタノール、テトラヒドロフラン等の溶媒中、例えば金属ナトリウム、金属カリウム等のアルカリ金属や、例えばナトリウムメトキシド、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン等の塩基の存在下に20~80℃で、4~8時間反応させることによりエポキシ体とする。次いで、これを、これ1モルに対して通常1~5モル、好ましくは2~3モルの本発明に係る一般式(1)で示される化合物の塩と、例えばベンゼン、トルエン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等の溶媒中、30~120℃で、6~24時間攪拌、反応させることにより、該1級又は2級の水酸基を容易に蛍光標識化することができる。

【0025】本発明の方法により蛍光標識化された糖類は、シアル酸、フコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン等を転移する糖転移酵素の受容体(アクセプター)として、また、例えばエンドグリコシダーゼ、エキソグリコシダーゼなど糖分解酵素の基質として、或は種々の糖鎖と反応するレクチンの活性測定や反応性の確認等に広く利用可能である。

【0026】また、本発明の方法によれば、還元末端側の糖残基にピリジルアミノ基が導入された場合でも、従来の方法の場合と異なり該糖残基は開環されないため、このようにして得られた蛍光標識化糖類は、還元末端の糖残基が関与する反応に支障なく使用することが可能である。

【0027】更に、本発明の方法は、高い収率で目的の蛍光標識化糖類を得ることができるため、ラクトース等の入手しやすい糖質以外の糖質の蛍光標識化にも利用することが可能である。以下に参考例及び実施例を挙げて

50

(5)

特開平6-148185

7

8

本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0028】

【実施例】参考例1. 2-(2-ヒドロキシエチル)アミノピリジンの合成

2-クロロピリジン25gとエタノールアミン80gとを、150℃で5時間攪拌下に反応させた。反応終了後、反応混合物から目的物をクロロホルムにより抽出し、クロロホルムを留去して、針状結晶の2-(2-ヒドロキシエチル)アミノピリジン10.6gを得た。

融点：65～68℃。

IR ν ppm(KBr) cm^{-1} : 3500～3100(NH, OH)、3000～2800($-\text{CH}_2-$)、780(ピリジン環)。

【0029】参考例2. 2-(3-ヒドロキシプロピル)アミノ

表1

* ノピリジンの合成

2-クロロピリジン25gと3-アミノ-1-プロパノール100gとを、150℃で5時間攪拌下に反応させた。反応終了後、反応混合物から目的物をクロロホルムで抽出し、クロロホルムを留去して、針状結晶の2-(3-ヒドロキシプロピル)アミノピリジン8.4gを得た。

融点：60～63℃。

IR ν ppm(heat) cm^{-1} : 3500～3100(NH, OH)、3000～2800($-\text{CH}_2-$)、780(ピリジン環)。上記参考例1及び2で得られたアミノピリジン誘導体と原料の2-アミノピリジルの、蛍光波長及び蛍光強度の測定を行った結果を表1に示す。尚、測定は夫々1N-HClを用いて調製した1 μ M溶液を使用して行った。§

【表1】

| 化合物名 | 励起波長 λ_{EX} (nm) | 蛍光波長 λ_{EM} (nm) | 蛍光強度比 |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| 2-アミノピリジン | 303 | 368 | 100 |
| 2-(2-ヒドロキシエチル)アミノピリジン | 313 | 391 | 29 |
| 2-(3-ヒドロキシプロピル)アミノピリジン | 313 | 388 | 14 |

【0030】実施例1. 2-ピリジルアミノエチル β -ラクトシド(LacF2)の合成

ラクトース50g、無水酢酸250ml及び酢酸ナトリウム25gを沸騰水浴中で加熱、反応させて、ラクトースをアセチル化した。反応終了後、得られた結晶をメタノールから再結晶して、オクタアセチルラクトース60gを得た。このオクタアセチルラクトース10gをジメチルホルムアミド50mlに溶解し、これに、2.5gのヒドラジン酢酸をジメチルホルムアミド15mlに溶解したものを加えた後、60℃で3時間攪拌下に反応させた。反応終了後、反応液を冷却し、酢酸エチル200mlで目的物を抽出、抽出液を水洗後、溶媒を留去して、1-ヒドロキシペンタアセチルラクトース8.3gを得た。この1-ヒドロキシペンタアセチルラクトース8gをジクロロメタン80mlに溶解後冷却し、これにトリクロロアセトニトリル33ml及び1,8-ジアザビシクロ-[5,4,0]-7-ウンデカン1mlを加えて、氷冷下で2時間攪拌、反応させた。反応終了後、反応液から溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラム[4.6×20cm、充填剤：ワコーゲル C-300(和光純薬工業株式会社商品名)、溶離液：ジクロロメタンとメタノールの混合溶媒]で精製して、トリクロロイムデート化したペンタアセチルラクトース8.7gを得た。このトリクロロイムデート化したペンタアセチルラクトース1gを25mlのジクロロメタンに溶解したものに、2-(2-ヒドロキシエチル)アミノピリジン250mgとモレキュラーシーブ2gを加えて、

室温で30分間反応させた。反応終了後、反応液を氷冷し、次いでこれに三フッ化ほう素-ジエチルエーテル350mlを加えた後、5時間放置した。反応液から溶媒を留去後、残渣に5mlの0.3%ナトリウムメトキシドを加え、5℃で一晩反応させた。反応終了後、反応液を酢酸で中和し、溶媒を留去して得られた残渣をエタノールと水との混合溶媒から結晶化してLacF2 490mgを得た。得られたLacF2の構造確認は、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)及び種々のエキソグリコシダーゼを使用して、以下の如くして行った。

(HPLC条件)

装置：SHIMADZU LC-6A((株)島津製作所製)。

カラム：Wakopak 5C18 (4.6×150mm、和光純薬工業(株)製)。

溶離液A：100mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0)。
溶離液B：10% メタノールを含む100mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0)。

グラジエント：A→B(50%) 0→12分 (リニアグラジエント)

流速：1.5ml/min

カラム温度：55℃

蛍光検出：励起波長：320nm、蛍光波長：400nm。

(操作法)

① β -ガラクトシダーゼによる消化

LacF2を500 μ g/mlとなるように蒸留水に溶解し、そ

(6)

特開平6-148185

9

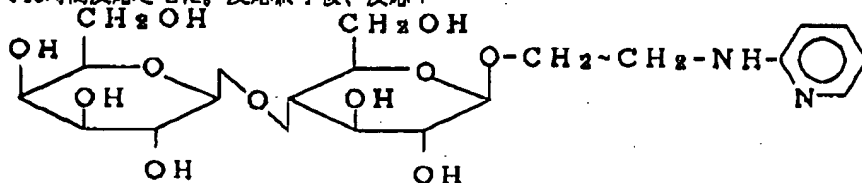
の10 μ lと50mMリン酸緩衝液 (pH6.0) 50 μ lとを混合したものに β -ガラクトシダーゼ懸濁液 (和光純薬工業(株)製) 1 μ lを添加してよく混合した後、37 $^{\circ}$ Cで18時間反応させた。反応終了後、反応液 (以下、処理液1と略記する。) 10 μ lを50mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で25倍に希釈し、その10 μ lをHPLCにより分析した。

② α -グルコシダーゼによる消化

上記①で得た処理液1 2 μ lと100mM酢酸緩衝液 (pH6.0) 50 μ lとを混合したものに α -グルコシダーゼ (和光純薬工業(株)製) 10unitを添加してよく混合した後、37 $^{\circ}$ Cで18時間反応させた。反応終了後、反応液10 μ lをHPLCにより分析した。

③ β -グルコシダーゼによる消化

上記①で得た処理液1 2 μ lと100mM酢酸緩衝液 (pH6.0) 50 μ lとを混合したものに β -グルコシダーゼ (ペーリンガー・マンハイム社製) 10unitを添加してよく混合した後、37 $^{\circ}$ Cで18時間反応させた。反応終了後、反応*



【0031】

【発明の効果】以上述べた如く、本発明は、微量物質の蛍光標識化に極めて有効なビリジルアミノ基を、例えば糖質、糖蛋白質、糖脂質、アルコール類、フェノール類等の水酸基を有する化合物に導入するための試薬と方法※

* 液10 μ lをHPLCにより分析した。

(結果) HPLCによる分析の結果、LacF2溶液 (4 μ g/ml) を試料として上記と同様の条件でHPLCによる分析を行ったところ、得られた蛍光ピークの保持時間は6.1分であり、2-(2-ヒドロキシエチル)アミノビリジン溶液 (1 μ g/ml) を試料として上記と同様の条件でHPLCによる分析を行ったところ、得られた蛍光ピークの保持時間は5.3分であった。一方、処理液1を試料とした場合の蛍光ピークは5.1分に出現し、処理液1と α -グルコシダーゼとを反応させた後の溶液を試料とした場合の蛍光ピークは5.1分に出現し、処理液1と β -グルコシダーゼとを反応させた後の溶液を試料とした場合の蛍光ピークは5.3分に出現した。以上の結果から、LacF2の構造は下記の如くであることが明らかとなった。

【化1】

※を提供するものであり、本発明によれば、従来法に比較して容易に且つ収率良くビリジルアミノ基を糖類やアルコール類、フェノール類等に導入し得る点に優れた効果を奏するものであり、新薬に貢献するところ大なる発明である。

【手続補正書】

【提出日】平成5年1月29日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正内容】

【0023】また、例えば糖類やアルコール類、フェノール類の1級又は2級水酸基を蛍光標識化する場合も、自体公知の水酸基の活性化方法を利用することにより容易に実施し得る。即ち、例えば糖類やアルコール類、フェノール類の1級又は2級水酸基を蛍光標識化する場合には、例えばビリジン、クロロホルムートリエチルアミン等の溶媒中で、糖類やアルコール類、フェノール類に、例えば p -トルエンスルホンクロライド、メタンスルホンクロライド等を反応させる常法により、1級又は2級水酸基に例えば p -トルエンスルホン基、メタンスルホン基等の脱離基を導入し、次いでこれを、これ1モルに対して通常1~5モル、好ましくは2~3モルの本発明に係る一般式(1)で示される化合物の塩と、例

えばベンゼン、トルエン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等の溶媒中、30~120 $^{\circ}$ Cで、8~24時間攪拌、反応させれば、該1級又は2級水酸基を容易に蛍光標識化することができる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】

【実施例】参考例1. 2-(2-ヒドロキシエチル)アミノビリジンの合成

2-クロロビリジン25gとエタノールアミン80gとを、150 $^{\circ}$ Cで5時間攪拌下に反応させた。反応終了後、反応混合物から目的物をクロロホルムにより抽出し、クロロホルムを留去して、針状結晶の2-(2-ヒドロキシエチル)アミノビリジン10.6gを得た。

融点: 65~68 $^{\circ}$ C。IR ν max (KBr) cm^{-1} : 3500~3100 (NH, OH), 3000~2800

(7)

特開平6-148185

(-CH₂-)、780(ピリジン環)。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】参考例2. 2-(3-ヒドロキシプロピル)アミノピリジンの合成

2-クロロピリジン25gと3-アミノ-1-プロパノール100gとを、150℃で5時間攪拌下に反応させた。反応終了後、反応混合物から目的物をクロロホルムで抽出し、クロロ*

*ホルムを留去して、針状結晶の2-(3-ヒドロキシプロピル)アミノピリジン8.4gを得た。

融点：60～63℃。

IR ν_{max}(neat)cm⁻¹：3500～3100(NH, OH)、3000～2800(-CH₂-)、780(ピリジン環)。上記参考例1及び2で得られたアミノピリジン誘導体と原料の2-アミノピリジルの、蛍光波長及び蛍光強度の測定を行った結果を表1に示す。尚、測定は夫々1N-HClを用いて調製した1 μM溶液を使用して行った。

【表1】

表1

| 化合物名 | 励起波長 λ _{EX} (nm) | 蛍光波長 λ _{EM} (nm) | 蛍光強度比 |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|-------|
| 2-アミノピリジン | 303 | 358 | 100 |
| 2-(3-ヒドロキシプロピル)アミノピリジン | 318 | 391 | 29 |
| 2-(3-ヒドロキシプロピル)アミノピリジン | 318 | 388 | 14 |

フロントページの続き

(72)発明者 田中 巧

尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社
大阪研究所内